

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-21296

(43) 公開日 平成11年(1999) 1月26日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 K 7/06	Z N A	C 0 7 K 7/06	Z N A
A 6 1 K 38/00	A D S	7/08	
	A E D	14/47	
	A G Z	A 6 1 K 37/02	A D S
C 0 7 K 7/08			A E D
審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平9-172314	(71) 出願人	000006127 森永乳業株式会社 東京都港区芝5丁目33番1号
(22) 出願日	平成9年(1997) 6月27日	(72) 発明者	畠 清彦 栃木県河内郡南河内町祇園2丁目11番地6号
		(72) 発明者	照井 康仁 栃木県河内郡南河内町祇園3丁目1番地3号 E102
		(74) 代理人	弁理士 西澤 利夫

(54) 【発明の名称】 アポトーシス誘導ペプチドおよびアポトーシス誘導剤

(57) 【要約】

【課題】 副作用を示さず、かつ熱的にも安定で、腫瘍細胞に選択的に作用する特定のアミノ酸配列を含むアポトーシス誘導ペプチド、そのペプチド誘導体、およびこれらを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤を提供する。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるアポトーシス誘導ペプチドまたはこのペプチドの誘導体、および配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理学的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるアポトーシス誘導ペプチド、またはこのペプチドの誘導体。

【請求項2】 配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるアポトーシス誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理学的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、特定のアミノ酸配列を含むアポトーシス誘導ペプチドまたはこのペプチドの誘導体、およびこれらを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤に関するものである。さらに詳しくは、この発明は、医薬品、特にエイズ、リウマチ等の治療、または抗癌剤、癌転移抑制剤等として有用なアポトーシス誘導剤に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】アポトーシスは、プログラムされた細胞死の一種であり、周囲の細胞との接触の欠乏、細胞質の濃縮化、エンドヌクレアーゼの活性に関連したクロマチンの凝縮および核凝縮、核の断片化、膜被包性球状小体化、隣接するマクロファージもしくは上皮細胞などによる球状小体の食食、またはエンドヌクレアーゼ活性によりDNAのヌクレオソーム単位が180～200塩基長のDNAに断片化、といった現象が観察され、このような現象が認められるアポプティック体細胞の最終断片が隣接する細胞により食食される機構として論じられている[イムノロジー・ツデー (Immunology Today)、第7巻、第115～119ページ、1986年；サイエンス(Science)、第245巻、第301～305ページ、1989年]。

【0003】従来の癌治療法（例えば、化学療法、放射線療法等）においては、腫瘍細胞の大部分はネクローシスにより細胞死が惹起されていた。ネクローシスはアポトーシスとは異なり、周囲組織に炎症反応を惹起するため、強い発熱、悪心、嘔吐等の症状を伴っていた。一方、アポトーシスは周囲組織に炎症反応を伴わないため前記の症状は極めて少ないと予想されている。従って、腫瘍細胞をアポトーシスにより細胞死に至らしめることが、臨床応用において効率の良い癌治療法を開発するために有効であると考えられている。

【0004】アポトーシスは、胚発生過程または細胞代謝回転が盛んな正常細胞（例えば、肝、副腎皮質、前立腺等）の生理的細胞死において確認されている[インターナショナル・レビュー・オブ・サイトロジー (International Review of Cytology)、第68巻、第251～306ページ、1980年]。また、アポトーシスは、グルココルチコイド、放射線照射、NK細胞、キラー細胞、腫瘍壊死因子(TNF)、またはリンフォトキシン(LT)等

のサイトカイン類等によって誘導されることが報告されている[ネイチャー (Nature)、第284巻、第555～556ページ、1986年；インターナショナル・ジャーナル・オブ・ラジエーション・バイオロジー (International Journal of Radiation Biology)、第53巻、第65ページ、1988年；プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・ユーエスエー (Proceeding of the National Academy of Sciences, USA)、第83巻、第1881～1885ページ、1986年；ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第129巻、第1782～1787ページ、1982年；ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第140巻、第689～692ページ、1988年；ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・イムノロジー (European Journal of Immunology)、第17巻、第689～693ページ、1987年]。

【0005】また、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミド (Cycloheximide) またはRNA合成阻害剤であるアクチノマイシンD (Actinomycin D) が、ヒト白血病細胞HL-60に対してアポトーシスを誘導することも報告されている[ジャーナル・オブ・イムノロジー (Journal of Immunology)、第145巻、第1859～1867ページ、1990年]。

【0006】さらに、最近では、免疫細胞のアポトーシスに関与する細胞膜分子であるFas抗原に対する抗Fasモノクローナル抗体が調製され、この抗Fas抗体が種々のヒト細胞に対し致死活性を示すことが報告され[ジャーナル・オブ・エクスperimental・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、第169巻、第1747ページ、1989年]、抗Fas抗体の医薬への応用については種々の研究がなされており、例えば、エイズ、腫瘍、リウマチの治療剤等が報告されている[特開平2-237935号公報、特表平5-503281号公報；特開平8-208515号公報]。

## 【0007】

【発明が解決しようとする課題】前記のとおり、従来から、アポトーシス誘導活性を示す蛋白質等が知られているが、これらの蛋白質は高分子であることから、その抗原性、熱に対する安定性および化学合成の困難性等の問題を有していた。従って、抗原性等の副作用を示さず、かつ熱にも安定なアポトーシス誘導剤の発見が望まれていた。特に、腫瘍細胞に選択的に作用し、周囲の組織に有害な炎症反応を惹起しないアポトーシス誘導剤が強く望まれていた。また、安価かつ大量に化学合成による供給が可能で、実用性が高い低分子のアポトーシス誘導ペプチドの発見が望まれていた。

【0008】この発明は、以上のとおりの従来技術の現状に鑑みてなされたものであり、副作用を示さず、熱にも安定であり、腫瘍細胞を選択的に細胞死させるアポトーシス誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、およびこ

れらを有効成分として含有するアボトース誘導剤を提供することを目的としている。また、この発明は、安価かつ大量に化学合成による供給が可能で、実用性が高いアボトース誘導ペプチドとその誘導体を提供することを目的としている。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】この発明は、前記の課題を解決するものとして、配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるアボトース誘導ペプチド、またはこのペプチドの誘導体を提供する。また、この発明は、配列番号1のアミノ酸配列を含む5から20個のアミノ酸からなるアボトース誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドもしくは誘導体の薬理学的に許容される塩類、またはこれらの混合物を有効成分として含有するアボトース誘導剤を提供する。

【0010】以下、発明の実施の形態について詳しく説明する。なお、以下の説明において百分率(%)の表示は特に断りのない限り重量による値である。

#### 【0011】

【発明の実施の形態】この発明のアボトース誘導ペプチドは、5から20個のアミノ酸からなり、その配列中のいずれかの位置に配列番号1のアミノ酸配列を有することを特徴とするものである。このよなアボトース誘導ペプチドまたはその誘導体は、固相法、液相等の公知の方法によって化学的に合成することができる。

【0012】固相法による場合は、ペプチド合成用固相樹脂を使用して、アミノ酸ブロックを順次縮合させ、ペプチド鎖を延長して、ペプチドを合成する。アミノ酸ブロックとして、N末端および側鎖の反応性基を9-フルオレニルメトキシカルボニル（以下、Fmocと略記する）基等の保護基で保護したアミノ酸誘導体を使用し、C末端側からの縮合反応およびN末端側の脱保護基反応を反復して目的のペプチド鎖を合成する。次いで、N末端および側鎖の反応性基が保護されたペプチドを樹脂から切断して取り出し、脱保護反応を行うことにより、目的とするペプチドを得ることができる。

【0013】また、アボトース誘導ペプチドの誘導体は、アボトース誘導ペプチドの一部置換体または付加化合物等のペプチドの誘導体であり、C末端がアミド化またはアシル化されたペプチドの誘導体を例示することができる。特に、C末端がアミド化されたペプチドの誘導体を合成する場合には、前記のとおり、N末端および側鎖の反応性基が保護されたペプチドを樹脂から切断して取り出した後、このペプチドのC末端のアミド化を行い、さらに脱保護反応を行い、目的とするペプチドの誘導体を得ることができる。

【0014】また、C末端がアミド化されたペプチド誘導体を合成する場合には、通常の固相樹脂の代わりにC末端アミドペプチド合成用固相樹脂〔例えば、パーキン

・エルマー（Perkin Elmer）社製、Fmocアミドレジン〕を使用することもできる。この場合には、保護基の選択によって、脱樹脂および脱保護を同時に実施できるので便利である。

【0015】以上の操作を機械化、自動化したペプチド自動合成装置〔例えば、パーキン・エルマー社製、Model 433A〕を使用して実施することもできる。液相法による場合は、N末端、C末端、および側鎖の反応性基を保護基で保護したアミノ酸誘導体をアミノ酸ブロックとし、これを使用して縮合反応、およびN末端またはC末端の脱保護基反応を反復して目的のペプチド鎖を合成する。さらに、液相法においてはC末端側またはN末端側から順次ペプチド鎖を延長する逐次鎖延長法に代えて、目的とするペプチド鎖を適当なフラグメントに分割し、各フラグメント鎖を合成した後、各フラグメント鎖を縮合させて目的とするペプチド鎖を合成するフラグメント法を適用することもできる。

【0016】次に、この発明のアボトース誘導剤について説明する。この発明のアボトース誘導剤は、前記のとおり化学合成されたアボトース誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、このペプチドまたはその誘導体の薬理学的に許容される塩類（以下、これらをまとめて「ペプチド類」と記載することがある。）、またはそれらの混合物を有効成分として含有している。

【0017】このアボトース誘導剤の有効成分として使用することのできるアボトース誘導ペプチドの薬理学的に許容される塩類、またはこのペプチド誘導体の薬理学的に許容される塩類は、無毒性の塩であり、具体的には酸付加塩、金属錯体、カルボン酸塩等である。前記酸付加塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、りん酸塩、タンニン酸塩、シュウ酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、アルギン酸塩、マレイン酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩、クエン酸塩、安息香酸塩、コハク酸塩、リンゴ酸塩、アスコルビン酸塩、酒石酸塩等を例示することができる。また、前記金属錯体としては、例えば、亜鉛、鉄、カルシウム、マグネシウムまたはアルミニウム等の錯体を例示することができる。さらに、前記カルボン酸塩としては、例えば、アルカリ金属とのナトリウム塩、カリウム塩等、アルカリ土金属とのカルシウム塩、マグネシウム塩等、アンモニウム塩等を例示することができる。

【0018】この発明のアボトース誘導剤は、ペプチド類から選択された任意の1種の化合物または2種以上の混合物を有効成分として含有していることが必要であるが、この有効成分の他に、公知のアボトース誘導性物質を含有していてもよい。この発明のアボトース誘導剤は、一般的な医薬製剤の形態でヒトまたは動物に投与することができ、例えば、静注、皮下注、または経口によりヒトまたは動物に投与することができる。

【0019】この発明のアボトース誘導剤の有効成分



であるペプチド類は、毒性が極めて低く、LD<sub>50</sub>は100mg/体重kg以上であるため、ヒトまたは動物に対して安全に使用することができる。この発明のアポトーシス誘導剤は、ペプチド類、またはそれらの2種以上の混合物を有効成分として5mg/g以上の濃度で含有させ、その他の成分とともに製剤化することができる。その他の成分としては、医薬製造分野で通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤の希釈剤、賦形剤等を例示することができる。また、剤形としては、各種の形態が治療目的に応じて選択可能であり、その代表的なものとして錠剤、丸剤、散剤、液剤、懸濁剤、乳剤、顆粒剤、カプセル剤、坐剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）等を例示することができる。

【0020】例えば、錠剤に成形する場合、乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、リン酸カルシウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を適宜使用することができる。また、錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、腸用被錠フィルムコーティング錠または二重錠、多層錠とすることもできる。

【0021】注射剤を調製する場合は、液剤、乳剤および懸濁剤は殺菌され、かつ血液と等張であるのが好ましく、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用することができる。なお、この場合、等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖、グリセリン等を含有させることも可能であり、また、溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を配合することもできる。

【0022】前記各形態の医薬製剤には、さらに必要に応じて慣用される着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等を配合することができ、また、他の医薬品有効成分を含有させることもできる。さらに、この発明のアポトーシス誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、またはアポトーシス誘導剤は、必要に応じて、他のアポトーシス

誘導性物質、例えば癌化学療法剤として公知の各種制癌剤と併用して使用することもでき、また、放射線療法と併用して使用することもできる。この結果、この発明のアポトーシス誘導ペプチド、このペプチドの誘導体、またはアポトーシス誘導剤は、優れた制癌効果も奏し得ることから、併用した他の制癌剤の効果を一層助長し、相乗効果を発揮させることができる。従って、併用した制癌剤の使用量を通常の使用量より少量とした場合でも、十分な癌治療効果が得られるので、併用する制癌剤の副作用の軽減化を図ることもできる。

【0023】次に、試験例を示してこの発明の作用効果を詳しく説明する。

#### 試験例1

この試験は、この発明のアポトーシス誘導ペプチドがアポトーシスを誘導するか否かを調べるために行った。

#### (1) 試料の調製

実施例1と同一の方法により、化学合成した配列番号1のアミノ酸配列を有するアポトーシス誘導ペプチドを、ダルベッコリン酸緩衝液〔ジャーナル・オブ・エクスペリメンタル・メディシン (Journal of Experimental Medicine)、第99巻、第167～182ページ、1954年〕に、それぞれ0.3  $\mu$ g/mlおよび3  $\mu$ g/mlの各濃度で溶解し、試料溶液として使用した。

【0024】また、アポトーシス誘導ペプチド無添加（0  $\mu$ g/ml）のダルベッコリン酸緩衝液を対照溶液として使用した。

#### (2) 試験方法

この試験は、MTT法〔ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ (Journal of Immunological Methods)、第65巻、第55ページ、1983年〕に従って次のとおり実施した。

【0025】ヒト赤芽球性白血病細胞（K562）をGIT培地（日本製薬社製）で $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度に調整した後、この細胞溶液10  $\mu$ l、D-MEM およびHam's F12混合培地〔D-MEM 基礎培地（ギブコ社製）10.2g、Ham's F12 基礎培地（ギブコ社製）10.86g、炭酸水素ナトリウム（和光純薬社製）4.8g、HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid、同仁化学社製）7.33g、硫酸ストレプトマイシン（200mg/ml、明治製菓社製）1.02ml、およびペニシリンGカリウム（20万単位/ml、明治製菓社製）1.02mlを精製水に溶解し、全量1リットルにメスアップしたもの。〕50  $\mu$ l、および試料溶液または対照溶液50  $\mu$ lを96ウェル培養プレート（ヌンク社製）の各ウェルに添加した後、5%炭酸ガス存在下で37℃の温度条件にて48時間培養した。培養終了後、ダルベッコリン酸緩衝液に5mg/mlの濃度で溶解したMTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide、シグマ社製) 溶液10  $\mu$ lを各ウェルに添加し、さらに4時間培養した後、0.04N塩酸-2-プロパノール溶液を100  $\mu$ l添加し、十分混合し、

マイクロプレートリーダー（バイオラッド社製）により各ウェルの吸光度（595nm）を測定した。

【0026】なお、前記試験において使用したヒト赤芽球性白血病細胞（K562）は、ヒト白血病細胞株で、その細胞の性質は文献「ブラッド（Blood）、第45巻、第321～322 ページ、1979年」に記載されており、細胞寄託機関「アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）」に寄託番号ATCC No. CCL-243として寄託されており、分譲可能である。

### （3）試験結果

この試験の結果は表1に示すとおりである。表1から明らかとなり、細胞のMTT還元能力〔MTT-フォルマザン(MTT formazan)量〕は、アポトーシス誘導ペプチド無添加群と比較して、添加群において有意に減少しており、アポトーシス誘導活性が確認された。

【0027】また、表1は、この発明のアポトーシス誘導ペプチドが、0.3 μg/mlという極めて低い濃度で白血病細胞の増殖抑制効果を有することも示している。

【0028】

【表1】

ペプチド濃度 (μg/ml)	MTT-フォルマザン量 (吸光度: 595nm)
0	0.987
0.3	0.928
3	0.888

### 試験例2

この試験は、この発明のアポトーシス誘導ペプチドのアポトーシス誘導率を調べるために行った。

#### （1）試料の調製

試験例1と同一の方法により、試料溶液および対照溶液を調製した。

#### （2）試験方法

この試験は、アポプ・タグ in situ アポプトシス検出キット（オンコア社製。以下、キットと略記する）を使用し、次のとおり実施した。

【0029】ヒト赤芽球性白血病細胞（K562）をGIT培地（日本製薬社製）で $1 \times 10^6$ 個/mlの濃度に調整し、この細胞溶液10μl、試験例1に記載のD-MEM およびHam's F12 混合培地50μl、および試料溶液または対照溶液50μlを96ウェル培養プレート（メンコ社製）の各ウェルに添加し、5%炭酸ガス存在下で37℃の温度条件にて48時間培養した。

【0030】培養終了後、ウェル中の培養液をサイトスピン2システム（シャンドン社製）を使用して、牛胎児血清（ギブコ社製）で表面を処理したスライドグラス（マツナミガラス社製。白緑磨フロストNo.2、76×26mm）に細胞を回収し、直ちに乾燥させ、スライドグラス上に細胞を固定した。0.2 M塩化ナトリウム（和光純薬社製）を含有する50 mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.

4：リン酸ナトリウムは和光純薬社製。以下、PBSと略記する）でスライドグラス上の細胞（以下、検体と記載する）を5分間洗浄し、さらにPBSを2回交換して各回5分間ずつ細胞を洗浄した。

【0031】次いで、室温条件下、2%過酸化水素（和光純薬社製）を含むPBS溶液で検体を5分間処理し、内在性のペルオキシダーゼを不活性化させた。続いて、PBSを使用して検体を5分間洗浄し、さらにPBSを交換し、5分間検体を洗浄し、検体周囲の余分な水分を慎重に紙タオルで吸い取り、直ちに検体上にキット添付の平衡緩衝液108 μlを直接滴下し、室温条件下、10分間放置した。その後、余分な平衡緩衝液を廃棄し、検体周囲の水分を紙タオルで吸い取り、キット添付のターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ（以下、TdTと略記する）酵素溶液54μlをピペットで検体上に滴下し、37℃で1時間保持し、酵素反応処理を行った。

【0032】酵素反応処理後、キット添付の反応停止・洗浄緩衝液中に検体を浸漬し、37℃で30分間保持した。次いで、PBSにより検体を5分間洗浄し、さらにPBSを3回交換して各回5分間ずつ検体を洗浄し、キット添付の抗ジゴキシゲニン・ペルオキシダーゼ溶液2滴を検体に滴下して室温で30分間保持した。その後、PBSにより検体を5分間洗浄し、さらにPBSを3回交換して各回5分間ずつ室温で検体を洗浄した。

【0033】PBS中に0.05%ジアミノベンジジン（ナカライテスク社製。以下、DABと略記する）を含有するDAB基質溶液に0.02%濃度で過酸化水素水を添加した溶液を、洗浄直後の検体を完全に覆うために十分な量を滴下し、室温で6分間染色した。その後、蒸留水により検体を1分間洗浄し、さらに蒸留水を3回交換して各回1分間ずつ検体を洗浄した。次いで、0.5%メチルグリーン0.1 M酢酸ナトリウム溶液（pH4.0：メチルグリーンおよび酢酸ナトリウムはいずれも和光純薬社製）で室温条件下10分間検体を対比染色した。

【0034】染色後、蒸留水で検体を洗浄し、さらに100%ブタノール（和光純薬社製）により洗浄し、キシレン（和光純薬社製）により検体を脱水し、エンテランニュー（メルク社製。登録商標）中に検体を固定し、カバーグラスで覆い、試料プレパラートを作成した。前記試料プレパラートを光学顕微鏡を使用して観察し、メチルグリーンで緑色に染色され、アポトーシスを惹起していない細胞数Xと、DABで黒褐色に染色され、アポトーシスを惹起した細胞（凝集細胞）数Yとを計数し、次式によりアポトーシス誘導率を算出した。

【0035】

アポトーシス誘導率(%) =  $Y / (X + Y) \times 100$

### （3）試験結果

この試験の結果は表2に示すとおりである。表2から明らかとなり、アポトーシス誘導ペプチド無添加群に比

較して、添加群においてアポトーシス誘導率は有意に上昇しており、アポトーシス誘導促進効果が確認された。

【0036】また、表2は、この発明のアポトーシス誘導ペプチドが、0.3  $\mu\text{g/ml}$ という極めて低い濃度で白血病細胞に対するアポトーシス誘導効果を有することも示している。

【0037】

【表2】

ペプチド濃度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	アポトーシス 誘導率 (%)
0	3.8
0.3	6.5
3	8.1

次に実施例を示してこの発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、この発明は以下の例に限定されるものではない。

【0038】

【実施例】

実施例1

ペプチド自動合成装置（パーキン・エルマー社製。Model 433A）を使用し、シェパード等 [ジャーナル・オブ・ケミカル・ソサイエティー・パーキン I (Journal of Chemical Society Perkin I)、第538 ページ、1981年] による固相法および同装置の使用説明書に基づいてペプチドを次のとおり合成した。

【0039】ペプチド合成用固相樹脂としてHMP樹脂（パーキン・エルマー社製）500mg (0.25mmol) を使用し、前記ペプチド自動合成装置の合成プログラムにより脱保護基反応および縮合反応を反復してペプチド鎖を延長した。詳しくは、20%ピペリジン含有N-メチルピロリドン（パーキン・エルマー社製。以下、N-メチルピロリドンをNMPと略記する）により、上記固相樹脂のアミノ保護基であるFmoc基を切断除去し、NMPで洗浄した後、Fmoc-アミノ酸 [具体的には、Fmoc-L-Arg(Pmc)-OH（パーキン・エルマー社製）] をFastMoc [登録商標] リージェントキット（パーキン・エルマー社製）を使用して縮合させ、NMPで洗浄する。以下、前記Fmoc基の切断、各Fmoc-アミノ酸の縮合、および洗浄までの操作を反復した。

【0040】Fmoc-アミノ酸として、Fmoc-L-Pro-OH、Fmoc-L-Leu-OH、Fmoc-L-Val-OH、およびFmoc-L-Ala-OH（いずれもパーキン・エルマー社製）を順次使用した。ペプチド鎖の伸長反応が完了した後、20%ピペリジン含有NMPによりN末端のFmoc基を切断し、NMPおよびジクロロメタン（パーキン・エルマー社製）で洗浄し、真空乾燥して保護ペプチド樹脂を約513mg 得た。

【0041】なお、縮合反応条件および脱保護条件は、フィードバックモニタリングシステムにより自動的に制御した。前記保護ペプチド樹脂 510mgにエタンジチオー

ル（渡辺化学工業社製）0.5ml、結晶フェノール（東京化成工業社製）1.5g、チオアニソール（渡辺化学工業社製）1.0ml、および精製水1.0ml を添加して室温で15分間攪拌し、のち氷冷し、さらに10分間攪拌した。これにトリフルオロ酢酸（渡辺化学工業社製。以下、TFAと略記する）20mlを添加して1.5 時間攪拌し、グラスフィルターで樹脂を濾去し、濾液を手早く減圧濃縮し、残渣に予め冷却した無水ジエチルエーテル（国産化学社製）を添加し、ペプチドを白色粉末化した。白色粉末化したペプチドを遠沈管に移し、冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離（2500rpm で10分間）し、上清を廃棄した。さらに冷ジエチルエーテルを新たに添加して十分攪拌し、遠心分離する操作を3回反復し、ペプチド沈殿物を真空乾燥し、水に溶解して凍結乾燥し、粗製ペプチド約105mg を得た。

【0042】前記粗製ペプチドの全量を精製水に溶解し、遠心分離（15000rpmで5分間）し、上清を0.45 $\mu\text{m}$  フィルターで濾過し、この濾液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりペプチドの精製を行なった。HPLCは、ガリバーPU-986高圧グラジエントシステム（日本分光社製）を使用し、カラムは逆相系のLichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 10mm（メルク社製）を使用した。溶離液は0.1 %TFA/精製水をA液、80%アセトニトリル/A液をB液とし、A液からB液への濃度直線勾配により溶出した。得られたクロマトグラムは、ほぼ単一のピークであり、ピークに相当する画分を分取した。この分取操作を数回反復し、得られた画分を凍結乾燥し、精製ペプチド約38.6mgを得た。

【0043】分析用カラム [Lichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 4.6mm（メルク社製）] を使用し、得られた精製ペプチドのHPLC分析を行ない、精製物が単一であることをさらに確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有する5残基のアミノ酸配列からなるペプチドが得られていることを確認した。

【0044】この実施例で得られた精製ペプチドは試験例1および試験例2に記載されたとおり、アポトーシス誘導活性を有していた。

実施例2

固相樹脂として、HMP樹脂（パーキン・エルマー社製）500mg (0.25mmol) に変えてC末端アミドペプチド合成用固相樹脂であるFmocアミドレジン（パーキン・エルマー社製）397mg (0.25mmol) を使用したことを除き、実施例1と同一の方法によりペプチド自動合成装置でC末端がアミド化された精製ペプチド誘導体約34.6mgを得た。

【0045】分析用カラム [Lichrospher100RP-18(e) 250 $\times$ 4.6mm（メルク社製）] を使用し、得られた精製ペプチド誘導体のHPLC分析を行ない、精製物が単一で



あることをさらに確認した。また、精製ペプチドのアミノ酸配列等を、常法のアミノ酸分析、アミノ酸配列分析、元素分析、質量分析により確認し、配列番号1で表わされるアミノ酸配列を有する5残基のアミノ酸配列からなるC末端がアミド化されたペプチドの誘導体が得られていることを確認した。

【0046】この実施例で得られた精製ペプチドの誘導体は、試験例1および試験例2に記載の方法でアポト

実施例1と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチド	0.5 (%)
塩化ナトリウム	0.9
注射用蒸留水	98.6

#### 実施例4

次の組成の注射剤を常法により製造した。なお、アポトース誘導ペプチド誘導体以外の成分はいずれも市販品

アクチノマイシンD	0.5 (%)
塩化ナトリウム	0.005
注射用蒸留水	0.9
	98.595

#### 実施例5

1錠あたりの組成が次の組成の錠剤を常法により製造した。なお、アポトース誘導ペプチド以外の成分はいず

実施例1と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチド	1.0 (mg)
アクチノマイシンD	0.02
乳糖	162.98
結晶セルロース	30.0
ポリビニルピロリドン	5.0
ステアリン酸マグネシウム	1.0

#### 実施例6

1錠あたりの組成が次の組成の錠剤を常法により製造した。なお、アポトース誘導ペプチド誘導体以外の成分

実施例2と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチドk誘導体	1.0 (mg)
結晶セルロース	50.0
コーンスターチ	40.0
ステアリン酸マグネシウム	1.0
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	15.0
ポリエチレングリコール(分子量6000)	3.0
ヒマシ油	50.0
メタノール	40.0

#### 【0051】

【発明の効果】以上詳しく説明したとおり、この発明は新規なアポトース誘導ペプチドおよびアポトース誘導剤に関するものであり、この発明によって奏せられる効果は次のとおりである。

1) この発明のアポトース誘導ペプチドは、副作用が無く、少量で、特定の白血病細胞に対して選択的にアポトース誘導効果を示す。

2) この発明のアポトース誘導ペプチドは、安価かつ大量に化学合成による供給が可能であり、実用性が高く商業規模での提供が容易である。

シス誘導活性を試験した結果、有意なアポトース誘導活性を有することが確認された。

#### 実施例3

次の組成の注射剤を常法により製造した。なお、アポトース誘導ペプチド以外の成分はいずれも市販品である。

#### 【0047】

実施例1と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチド	0.5 (%)
塩化ナトリウム	0.9
注射用蒸留水	98.6

である。

【0048】実施例2と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチドの誘導体

0.5 (%)
0.005
0.9
98.595

れも市販品である。

#### 【0049】

実施例1と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチド	1.0 (mg)
アクチノマイシンD	0.02
乳糖	162.98
結晶セルロース	30.0
ポリビニルピロリドン	5.0
ステアリン酸マグネシウム	1.0

はいずれも市販品である。

#### 【0050】

実施例2と同一の方法により得たアポトース誘導ペプチドk誘導体	1.0 (mg)
結晶セルロース	50.0
コーンスターチ	40.0
ステアリン酸マグネシウム	1.0
ヒドロキシプロピルメチルセルロース	15.0
ポリエチレングリコール(分子量6000)	3.0
ヒマシ油	50.0
メタノール	40.0

3) この発明のアポトース誘導ペプチドは、ヒト正常細胞に対してはアポトース誘導効果を示さない。

4) この発明のアポトース誘導ペプチドは、従来の化学療法、放射線療法等の癌治療に伴う周囲組織の炎症反応を惹起することなく、腫瘍細胞をアポトースにより細胞死に至らしめることができるという利点を有している。

#### 【0052】

#### 【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列の特徴：このペプチド、およびこのペプチドをフラ

グメントとして含むペプチド。

配列：

Ala Val Leu Pro Arg

1 5

---

フロントページの続き(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 0 7 K 14/47

識別記号

F I

A 6 1 K 37/02

A G Z

TRANSLATION FROM JAPANESE

- (19) JAPANESE PATENT OFFICE (JP)  
(12) Unexamined Patent Gazette (A)  
(11) Unexamined Patent Application (Kokai) No. **11-21296** [i.e., 1999-21296]  
(43) Disclosure Date: 26 January 1999
- 

(51) Int. Cl. <sup>6</sup> :	Classification Symbols:	F I			
C 07 K	7/06	ZNA	C 07 K	7/06	ZNA
A 61 K	38/00	ADS		7/08	
		AED		14/47	
		AGZ	A 61 K	37/02	ADS
C 07 K	7/08				AED

Request for Examination: Not yet submitted      Number of Claims: 2  
(Total of 8 pages [in original])      Continued on the final page

---

- (21) Application No.: 9-172314 [i.e., 1997-172314]  
(22) Filing Date: 27 June 1997  
(71) Applicant: 000006127  
Morinaga Milk Industry Co., Ltd.  
5-chome 33-ban 1-go Shiba, Minato-ku, Tokyo  
(72) Inventor: Kiyohiko Hatake  
2-chome 11-banchi 6-go Gion, Kawaramachi, Kawachi-gun, Tochigi  
Prefecture  
(72) Inventor: Yasuhito Terui  
E102, 3-chome 1-banchi 3-go Gion, Kawaramachi, Kawachi-gun,  
Tochigi Prefecture  
(74) Agent: Toshio Nishizawa, Patent Attorney
- 

(54) [ Title of the Invention ]      **Apoptosis-Inducing Peptide and Apoptosis-Inducing Agent**

(57) [ Summary ]

[ Object ] To provide an apoptosis-inducing peptide containing a specific amino acid sequence in SEQ ID NO: 1 acting selectively on tumor cells, not exhibiting side effects and that is thermally stable, a peptide derivative thereof, or an apoptosis-inducing agent containing these as an active ingredient.

[ Means ] An apoptosis derivative agent containing an apoptosis-inducing peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1 or a derivative of the peptide; and an apoptosis-inducing agent containing as an active ingredient a peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or its derivative, or a mixture thereof.

[ Claims ]

[ Claim 1 ] An apoptosis-inducing peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, or a derivative of the peptide.

[ Claim 2 ] An apoptosis-inducing agent containing as an active ingredient an apoptosis-inducing peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or the derivative, or a mixture thereof.

[ Detailed Description of the Invention ]

[ 0001 ]

[ Technological Field of the Invention ] The present invention relates to an apoptosis-inducing peptide containing a specific amino acid sequence, a derivative of the peptide, and an apoptosis-inducing agent containing these as an active ingredient. In greater detail, the invention relates to an apoptosis-inducing agent useful as a pharmaceutical product, particularly in the treatment of AIDS, rheumatism, and the like; an anticancer drug; a cancer metastasis inhibitor; or the like.

[ 0002 ]

[ Prior Art ] Apoptosis is one type of programmed cell death; phenomena observed include detachment from surrounding cells; condensation of cytoplasm; condensation and nuclear condensation of the chromatin related to endonuclease activity; nuclear fragmentation; shrinkage forming membrane-bound round bodies; phagocytosis of the small round bodies due to neighboring macrophages, epithelial cells, and the like; fragmentation of DNA nucleosome units into DNA of 180 to 200 bases in length due to endonuclease activity; it has been argued that apoptosis is the mechanism by which the final fragments of the apoptic cells in which such phenomena have been confirmed are phagocytized by neighboring cells [*Immunology Today* 7 (1986): 115 – 119; *Science* 245 (1989): 301 – 305].

[ 0003 ] Cell death occurred in the majority of tumor cells due to necrosis in conventional cancer treatments (for example, chemotherapy, radiation therapy, and the like). Unlike apoptosis, necrosis accompanied symptoms such as high fever, nausea, vomiting and the like because an inflammatory reaction is induced in the surrounding tissue. It is predicted that the aforementioned symptoms will be extremely slight with apoptosis because it is not accompanied by inflammatory reactions in the surrounding tissue. Thus, it is believed that causing tumor cells to die through apoptosis will be useful in developing effective cancer therapies for clinical application.

[ 0004 ] Apoptosis has been confirmed in the physiological cell death of normal cells (for example, liver, adrenal cortex, prostate, and the like) whose embryonic growth process or metabolic turnover had been vigorous [*International Review of Cytology* 68 (1980): 251 – 306]. It has also been reported that induction of apoptosis may be caused by glucocorticoid, radiation irradiation, NK cells, killer cells, tumor necrosis factor (TNF), and cytokines such as lymphotoxin, and the like [*Nature* 284 (1986): 555 – 556, *International Journal of Radiation Biology* 53 (1988): 65, *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA* 83 (1986): 1881 – 1885, *Journal of Immunology* 129 (1982): 1782 – 1787, *Journal of Immunology* 140 (1988): 689 – 692, *European Journal of Immunology* 17 (1987): 689 – 983].



[ 0005 ] It has also been reported that cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, and actinomycin D, an RNA synthesis inhibitor, induce apoptosis in human leukemia cells HL-60 [*Journal of Immunology* 145 (1990): 1859 – 1867].

[ 0006 ] Further, it has been reported recently that when anti-Fas monoclonal antibodies are prepared, which are cell membrane molecules participating in immune cell apoptosis, the anti-Fas antibodies exhibit fatal activity on human cells [*Journal of Experimental Medicine* 169 (1989): 1747]; various research into the application to anti-Fas antibody medicine is underway; for example, therapeutic agents, etc., for AIDS, tumors and rheumatism have been reported (Unexamined Patent Application Publication Number 2-237935 [i.e., 1990-237935, PCT (WO) 5-503281 [i.e., 1993-503281], and Unexamined Patent Application Publication Number 8-208515 [i.e., 1996-28515]).

[ 0007 ]

[ Problems to be Solved by the Invention ] As mentioned above, proteins and the like exhibiting apoptosis-inducing activity have been known conventionally, but these proteins are macro molecules, so they had problems such as that antigenicity, heat stability and chemical synthesis are difficult. The discovery of an apoptosis-inducing agent not exhibiting side effects such as antigenicity and that is thermally stable has thus been desired. In particular, an apoptosis-inducing agent that acts selectively on tumor cells without inducing harmful inflammatory reactions in surrounding tissue has been strongly desired. The discovery of a low molecular apoptosis-inducing peptide which can be supplied inexpensively and in mass quantity through chemical production and that is highly practical has also been desired.

[ 0008 ] The circumstances of the prior art as above have been taken into consideration when devising the invention, and it is an object thereof to provide an apoptosis-inducing peptide, a derivative of the peptide, and an apoptosis-inducing agent containing these as an active ingredient which do not exhibit side effects and are thermally stable, and which selectively kill tumor cells. Another object of the invention is to provide an apoptosis-

inducing peptide and a derivative thereof which can be supplied inexpensively and in mass quantity through chemical synthesis, and which has high practicality.

[ 0009 ]

[ Means to Solve the Problems ] The invention was devised to solve the aforementioned problems, and provides an apoptosis-inducing peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, and a derivative of the peptide. The invention also provides an apoptosis-inducing agent containing as an active ingredient an apoptosis-inducing peptide comprising 5 to 20 amino acids containing an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or derivative, or a combination thereof.

[ 0010 ] Embodiments of the invention will be described below in detail. When not otherwise particularly specified for the invention below, indications of percent (%) are values by weight.

[ 0011 ]

[ Embodiments of the Invention ] The apoptosis-inducing peptide of the invention is characterized by the fact of comprising 5 to 20 amino acids, and of having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 at any position in its sequence. Such an apoptosis-inducing peptide and its derivative can be chemically synthesized using a solid phase method, liquid phase method, or the like.

[ 0012 ] For the solid phase method, a solid phase resin for peptide synthesis is used to synthesize a peptide by successively condensing amino acid blocks and lengthening the peptide chain. An amino acid derivative whose N terminal or side chain reactive group is protected by a 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (abbreviated hereinafter as Fmoc) or other protecting block is used as an amino acid block to synthesize the object peptide chain by repeating condensation reactions from the C terminal and deprotection reactions on the N terminal side. Next, the peptide whose N terminal or side chain reactive group is protected is removed from the resin by cutting, and a deprotection reaction is carried out to yield the object peptide.

[ 0013 ] The derivative of the apoptosis-inducing peptide is a partial recombinant of the apoptosis-inducing peptide or an added compound or other derivative of the peptide, and the derivative of the peptide whose C terminal has been amidated or acylated can be exemplified. In particular, when synthesizing a derivative of a peptide whose C terminal is amidated, the peptide whose N terminal or side chain reactive group is protected is removed from the resin by cutting as mentioned above, after which amidation of the peptide's C terminal is carried out and another deprotection reaction is carried out to yield the object peptide derivative.

[ 0014 ] When synthesizing a peptide derivative whose C terminal is amidated, a solid phase resin for C terminal amide peptide synthesis [for example, Fmoc amide resin manufactured by Perkin Elmer] may be used instead of an ordinary solid phase resin. In this case, it is convenient to carry out deresination and deprotection at the same time by selecting the protective group.

[ 0015 ] The aforementioned operation can be carried out using a mechanized or automated peptide automatic synthesizer (for example, the Perkin Elmer 433A, etc.) For the liquid phase method, an amino acid derivative protected by a protecting group at the N terminal, C terminal or side chain reactive group is used as an amino acid block to synthesize the object peptide chain by repeating deprotection reactions of the N terminal or C terminal. Further, instead of the consecutive chain length lengthening method for successively lengthening the peptide chain from the C terminal end or N terminal end, in the liquid phase method, the object peptide chain can be broken into suitable fragments, and after synthesizing a fragment chain for each, a fragment method can be applied to condense the fragment chains and synthesize the object peptide chain.

[ 0016 ] The apoptosis-inducing agent of the invention will be described next. As mentioned above, the apoptosis-inducing agent of the invention contains as an active ingredient a chemically synthesized apoptosis-inducing peptide, a derivative of the peptide, a pharmacologically permissible salt of the peptide or its derivative (there are collectively noted as the "peptides" hereinafter), or a compound thereof.

[ 0017 ] The pharmacologically permissible salts of the apoptosis-inducing derivative which can be used as an active ingredient in the apoptosis-inducing agent and the pharmacologically permissive salts of the peptide derivative are non-toxic, and in concrete terms, may be an acid additive salt, metal complex, carboxylate or the like. The aforementioned acid additive salt may be exemplified with hydrochloride, hydrobromide, hydrosulfate, phosphate, tannate, oxalate, fumarate, gluconate, alginate, maleate, acetate, trifluoroacetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, tartrate or the like. Also, the aforementioned metal complex may be exemplified with, for example, complexes of zinc, iron, calcium, magnesium, aluminum, and the like. Further, the aforementioned carboxylate may be exemplified with, for example, an alkaline metal and its sodium, potassium or other such salt, an alkaline earth metal and its potassium, magnesium or other such salt, and ammonium salt or the like.

[ 0018 ] The apoptosis-inducing agent of the invention needs to contain one type of compound or two or more mixtures as an active ingredient arbitrarily selected from the peptides, but in addition to this active ingredient, it may contain a publicly known apoptosis-inducing substance as well. The apoptosis-inducing agent of the invention can be administered to humans or animals through general medical preparation forms, for example, it can be administered to humans or animals as an intravenous injection, subcutaneous injection or orally.

[ 0019 ] The peptides, which are active ingredients for the apoptosis-inducing agent of the invention, have extremely low toxicity, and may be used for humans or animals safely as the LD<sub>50</sub> is 100 mg/kg of body weight or higher. The apoptosis-inducing agent of the invention may contain one of the peptides or a mixture of two or more types thereof as an active ingredient in a concentration of 5 mg/g or higher, and may be prepared along with other ingredients. The other ingredients may be exemplified with fillers, extenders, binders, humectants agents, disintegrants, surfactants, diluents for lubricants, diluents and the like ordinarily used in medical manufacturing fields. The drug form may be selected according to the purpose of treatment, typical exemplifications including tablets, pills, powders,

liquids, suspension agents, emulsions, granulated powders, capsules, suppositories, injectables (liquid, suspension agent, etc.), and the like.

[ 0020 ] For example, when forming a tablet, a diluent such as lactose, sucrose, sodium chloride, glucose, urea, starch, calcium carbonate, kaolin, crystalline cellulose, or silicic acid; a binder such as water, ethanol, propanol, simple syrup, glucose solution, starch solution, gelatin solution, carboxymethylcellulose, methylcellulose, calcium phosphate, or polyvinyl pyrrolidone; a disintegrator such as dried starch, agar powder, laminaran powder, sodium bicarbonate, calcium carbonate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, sodium lauryl sulfate, monoglyceride stearate, starch, or lactose; a disintegration inhibitor such as sucrose, stearin, cacao butter, or hydrogenated oil; an absorption promoter such as quaternary ammonium base or sodium lauryl sulfate; a humectant such as glycerol or starch; an adsorbent such as starch, lactose, kaolin, bentonite, or colloidal silicic acid; and a lubricant such as purified talc, stearate, boric acid powder, or polyethylene glycol may be arbitrarily used. Also, the tablet may take the form of a coated tablet covered with any conventional coating or film as required, for example, a sugar-coated tablet, gelatin-coated tablet, enteric coated tablet or a film-coated tablet, or a double-layered or multi-layered tablet.

[ 0021 ] When preparing an injectable, it is desirable that a liquid, emulsion or suspension liquid be sterilized and be isotonic with blood; for a diluent, water, ethyl alcohol, propylene glycol, isostearyl alcohol ethoxylate, isostearyl alcohol polyoxalate, polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester, and the like, for example, may be used. In this case, it is possible to include an adequate quantity of table salt, glucose, glycerine and the like to prepare an isotonic solution; it is also possible to blend in a solubilizing agent, buffer agent, analgesic agent or the like.

[ 0022 ] Medical preparations in these forms may be further blended with a commonly used coloring agent, preservative, fragrant, flavoring agent, sweetening agent or the like according to need, and may also include other active pharmaceutical ingredients. The apoptosis-inducing peptide, a derivative of the peptide and the apoptosis-inducing agent of



the invention may further be used along with other apoptosis-inducing substances according to need, for example, publicly known cancer drugs as cancer chemotherapy, and may also be used along with radiation therapy. Thus, superior anticancer effects may be accomplished with the apoptosis-inducing peptide, a derivative of the peptide, and the apoptosis-inducing agent of the invention, so the effects of other cancer drugs used in conjunction may be extended one level further, and it is possible to bring about synergistic effects. Even when the amount of cancer drugs used in conjunction is less than the amount normally used, adequate cancer treatment effects can be obtained, so the side effects of the cancer drugs used in conjunction may thus be reduced.

[ 0023 ] Next, a sample test will be exhibited to describe working effects of the invention in detail.

#### Sample Test 1

This test was carried out to study whether the apoptosis-inducing peptide of the invention induces apoptosis.

##### (1) Preparation of the sample

An apoptosis-inducing peptide having an amino acid sequence in SEQ ID NO: 1 chemically synthesized using a method identical to that in Embodiment 1 was dissolved in Dulbecco's phosphate buffered saline [*Journal of Experimental Medicine* 99 (1954): 167 – 182] at respective concentrations of 0.3  $\mu\text{m}/\text{ml}$  and 3  $\mu\text{m}/\text{ml}$  for use as a sample solution.

[ 0024 ] Dulbecco's phosphate buffered saline with non-additive (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) apoptosis-inducing peptide was used as a control solution.

##### (2) Test method

The test was carried out according to the MTT method [*Journal of Immunological Methods* 65 (1983): 55].

[ 0025 ] After preparing human erythroblastic leukemia cells (K562) at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml in a GIT culture medium (manufactured by Dainippon Pharmaceutical), 10  $\mu\text{l}$  of the cell solution, 50  $\mu\text{l}$  of D-MEM and Ham's F12 mixed culture medium [10.2 g of D-MEM basal culture (manufactured by Gibco [sic]), 10.86 g of Ham's F12 basal culture

(manufactured by Gibco [sic]), 4.8 g of sodium hydrogen carbonate (manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.), 7.33 g of HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid, manufactured by Dojindo), 1.02 ml of streptomycin sulfate (200 mg/ml, manufactured by Meiji Seika Kaisha), and 1.02 ml of potassium G penicillin (200 thousand units/ml, manufactured by Meiji Seika Kaisha) dissolved in purified water to make a total amount of 1 liter], and 50 µl of the sample solution or control solution were added to each well in a 96-well culture medium plate (manufactured by Nunc), and this was cultured for 48 hours at the warm temperature of 37° C in the presence of 5% carbon dioxide gas. When the culturing was complete, 10 µl of a solution of MTT (3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, manufactured by Sigma) dissolved in Dulbecco's phosphate buffered saline at a concentration of 5 mg/ml was added to each well, and after culturing for 4 more hours, 100 µl of 0.04 N hydrochloric acid-2-propanol solution was added, this was adequately mixed, and the absorption of light (595 nm) in each well was measured with a microplate reader (manufactured by Bio-Rad).

[ 0026 ] The human erythroblastic leukemia cells (K562) used in the above-mentioned test are from a human leukemia cell strain, the nature of whose cells is noted in the literature [*Blood* 45 (1979): 321 – 322], and being available in lots, they were consigned through a cell consignment agency [American Type Culture Collection (ATCC) with the consignment number ATCC No. CCL-243.

### (3) Test results

The results of the test are as shown in Table 1. As is clear from Table 1, the MTT reduction capacity of the cells (amount of MTT-formazan) was significantly decreased in the additive group compared to the apoptosis-inducing peptide non-additive group, confirming apoptosis-inducing activity.

[ 0027 ] Table 1 also shows that the apoptosis-inducing peptide of the invention has propagation inhibiting effects on leukemia cells at the extremely low concentration of 0.3 µg/ml.

[ 0028 ]

[ Table 1 ]

Peptide concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Amount of MTT-formazan (Absorption of light: 595 nm)
0	0.987
0.3	0.928
3	0.888

### Sample Test 2

This test was carried out in order to study the apoptosis-inducement rate of the apoptosis-inducing peptide of the invention.

#### (1) Preparation of the sample

A sample solution and a control solution were prepared using the same method as in Sample Test 1.

#### (2) Test method

This test was carried out as follows using an ApopTag In Situ Apoptosis Detection kit (manufactured by Oncor; abbreviated hereinafter as the kit).

[ 0029 ] Human erythroblastic leukemia cells (K562) were adjusted to a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/ml in a GIT culture (manufactured by Dainippon Pharmaceutical), 10  $\mu\text{l}$  of the cell solution, 50  $\mu\text{l}$  of the D-MEM and Ham's F12 mixed culture noted in Sample Test 1, and 50  $\mu\text{l}$  of sample solution or control sample were added to each well in a 96-well culture plate (manufactured by Nunc), and this was cultured for 48 hours at the warm temperature of 37° C in the presence of 5% carbon dioxide gas.

[ 0030 ] When the culturing was complete, cells from the cultured liquid in the wells were collected on a glass slide (manufactured by Matsunami Glass Ind.; white frosted edge No. 2, 76  $\times$  76 mm) whose surface was treated with bovine fetal blood (manufactured by Gibco [sic]) using a Cytospin 2 System (manufactured by Shandon), this was immediately dried and the cells fixed on the glass slide. The cells (hereinafter, noted as the specimen) on the glass slide were washed for 5 minutes with 50 mM of sodium phosphate buffer liquid (pH

7.4: the sodium phosphate was manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc., hereinafter abbreviated as PBS) containing 0.2 M of sodium chloride (manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.), and then the cells were washed twice more changing the PBS each time.

[ 0031 ] Next, the specimen was treated for 5 minutes in PBS solution containing 2% hydrogen peroxide (manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.) in room temperature conditions, deactivating the endogenous peroxidase. Next, the specimen was washed for 5 minutes using PBS, the PBS was changed, and the specimen was washed for 5 minutes further; excess water around the specimen was taken up carefully with a paper towel, 108 µl of the equilibrated buffer liquid accompanying the kit was immediately dripped directly on top of the specimen, and this was allowed to sit for 10 minutes under room temperature conditions. Excess equilibrated buffer liquid was then discarded, water around the specimen was taken up with a paper towel, 54 µl of terminal deoxynucleotidyl transferase (abbreviated hereinafter as TdT) enzyme solution accompanying the kit was dripped on the specimen using a pipette, the specimen was held for 1 hour at 37° C and then treated with an enzyme reaction.

[ 0032 ] After the enzyme reaction treatment, the specimen was immersed in a stop and washing buffer solution accompanying the kit, and held for 30 minutes at 37° C. Next, the specimen was washed for 5 minutes in PBS, and then washed further 3 times for 5 minutes each changing the PBS each time, two drops of the anti-digoxigenin peroxidase solution accompanying the kit were dripped on the specimen, and this was held for 30 minutes at room temperature. The specimen was then washed for 5 minutes using PBS, and then washed further at room temperature 3 times each for 5 minutes changing the PBS each time.

[ 0033 ] A solution made by adding hydrogen peroxide at a concentration of 0.02% to a DAB substrate solution containing 0.05% diaminobenzidine (manufactured by Nacalai Tesque, Inc; abbreviated hereinafter as DAB) in PBS was dripped on the specimen immediately after washing in a quantity adequate to completely cover it, and this was

stained at room temperature for 6 minutes. The specimen was then washed for 1 minute using distilled water, and then washed further 3 times for 1 minute each changing the distilled water each time. Next, the specimen was counterstained for 10 minutes in room temperature conditions with a 0.5% methyl green [and?] 0.1 M sodium acetate solution (pH 4.0: both the methyl green and sodium acetate solution manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.).

[ 0034 ] After staining, the specimen was washed with distilled water and then washed again using 100% butanol (manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.), the specimen was dehydrated using xylene (manufactured by Wako Pure Chemical [Industries], Inc.), fixed in Enterannyuu [spelling unknown] (manufactured by Merck, Inc.; registered trademark), and covered with a cover glass to make a preparation. The aforementioned specimen preparation was observed using an optical microscope, the number of cells X stained green with methyl green for which apoptosis had not occurred and the number of cells Y (nucleated cells) stained blackish brown with DAB for which apoptosis had occurred were counted, and the apoptosis inducement rate was calculated with the following formula.

[ 0035 ] Apoptosis inducement rate (%) =  $Y/(X+Y) \times 100$

### (3) Test results

The results of this test are shown in Table 2. As is made clear from Table 2, the apoptosis inducement rate in the added group is significantly elevated over the apoptosis-inducing peptide non-additive group, confirming the promotion effects of apoptosis inducement.

[ 0036 ] Table 2 shows that the apoptosis-inducing peptide of the invention has apoptosis-inducing effects on leukemia cells at the extremely low concentration of 0.3 µg/ml.

[ 0037 ]

[ Table 2 ]

Peptide concentration (µg/ml)	Amount of MTT-formazan (Absorption of light: 595 nm)
0	3.8
0.3	6.5
3	8.1



The invention will next be described in detail and in a concrete manner, exhibiting embodiments, but the invention is not limited to the below embodiments.

[ 0038 ]

[ Embodiments ]

Embodiment 1

An automatic peptide synthesizer (Model 433A manufactured by Perkin Elmer) was used to synthesize a peptide based on the solid phase method of Shepard [spelling unknown], et al [*Journal of Chemical Society Perkin I* 538 (1981): 538] and the user's manual for the synthesizer.

[ 0039 ] 500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Perkin Elmer) were used as solid phase resin for peptide synthesis to lengthen the peptide chains by repeating deprotection group reactions and condensation reactions using a synthesis program of the aforementioned automatic peptide synthesizer. In greater detail, N-methyl pyrrolidone (manufactured by Perkin Elmer; N-methyl pyrrolidone is abbreviated as NMP below) containing 20% piperidine was used to remove the amino protecting group Fmoc from the aforementioned solid phase resin by cutting, this was washed with NMP, the Fmoc-amino acid [or in concrete detail, Fmoc-L-Arg (Pmc)-OH (manufactured by Perkin Elmer)] was condensed using a FastMoc [a registered trademark] Regent Kit (manufactured by Perkin Elmer), and this was washed with NMP. Below, the aforementioned operation from the cutting of the Fmoc group and condensation of each Fmoc-amino acid through the washing was repeated.

[ 0040 ] Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Val-OH and Fmoc-L-Ala-OH (all manufactured by Perkin Elmer) were successively used as Fmoc-amino acids. After the peptide chain extension reaction was complete, the Fmoc group at the N terminal was cut with NMP containing 20% piperidine, and this was washed with NMP and dichloromethane

(manufactured by Perkin Elmer), yielding approximately 513 mg of protection peptide resin after vacuum drying.

[ 0041 ] The condensation reaction conditions and deprotection conditions were automatically controlled using a feedback monitoring system. 0.5 ml of ethanedithiol (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), 1.5 g of crystal phenol (manufactured by Tokyo Kasei Co., Ltd.), 1.0 ml of thioanisole (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.), and 1.0 ml of purified water were added to the aforementioned 510 mg of protective peptide resin, this was agitated for 15 minutes at room temperature, and agitated for 10 minutes further after chilling. 20 ml of trifluoroacetic acid (manufactured by Watanabe Chemical Industries, Ltd.; abbreviated hereinafter as TFA) were added thereto and this was agitated for 1.5 hours; the resin was filtered through a glass filter, the filtered liquid was immediately vacuum concentrated, and pre-cooled anhydrous diethyl ether (manufactured by Kokusan Chemical Works, Ltd.) was added to the residue, and the peptide was white powdered. The white powdered peptide was transferred to a centrifuge tube, the cooled diethyl ether was newly added and the result adequately agitated, this was centrifuged (10 minutes at 2500 rpm), and the supernatant was discarded. Cooled diethyl ether was newly added yet again and the result was adequately agitated, an operation for centrifuging was carried out three times, the peptide precipitate was vacuum dried, and this was dissolved in water and freeze dried to yield approximately 105 g of crude peptide.

[ 0042 ] All of the aforementioned crude peptide was dissolved in purified water and centrifuged (for 5 minutes at 15,000 rpm), the supernatant was filtered through a 0.45  $\mu$ m filter, and peptide purification of the filtered liquid was carried out using high performance liquid chromatography (HPLC). A Gulliver-PU-986 high pressure gradient system (manufactured by JASCO Corp.) was used for the HPLC, and 250  $\times$  10 mm reverse phase Lichrospher 100RP-18 (e) columns (manufactured by Merck, Ltd.) were used. The eluent was eluted using a linear concentration gradient from liquid A to liquid B where liquid A was 0.1% TFA/purified water and liquid B was 80% acetonitrile/liquid A. The obtained chromatograph had nearly a single peak, and the fraction corresponding to the peak was

collected. The collection operation was repeated several times, and the obtained fractions were freeze dried to obtain approximately 38.6 mg of purified peptide.

[ 0043 ] Analysis columns [250 × 4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck)] were used to carry out an HPLC analysis of the obtained purified peptide, and it was confirmed that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was confirmed that a peptide comprising 5 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 had been obtained.

[ 0044 ] The purified peptide obtained in this Embodiment has apoptosis-inducing activity as noted in Sample Test 1 and Sample Test 2.

#### Embodiment 2

Approximately 34.6 mg of purified peptide derivative whose C terminal is amidated were obtained as a solid phase resin with the automatic peptide synthesizer using a method identical to that in Embodiment 1 except for using 397 mg (0.25 mmol) of Fmoc amide resin (manufactured by Perkin Elmer), a solid phase resin for peptide synthesis whose C terminal is amidated, instead of the 500 mg (0.25 mmol) of HMP resin (manufactured by Perkin Elmer).

[ 0045 ] Analysis columns [250 × 4.6 mm Lichrospher 100 RP-18(e) (manufactured by Merck, Ltd.)] were used to carry out an HPLC analysis of the obtained purified peptide derivative, confirming that the purified material was singular. The purified peptide amino acid sequence, etc., was also confirmed with ordinary amino acid analysis, amino acid sequence analysis, elemental analysis and mass spectrometry, and it was also confirmed that a derivate of the peptide whose C terminal is amidated comprising 5 amino acid residues having an amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1 had been obtained.

[ 0046 ] The results of testing the apoptosis-inducement activity with the method noted in Sample Test 1 and Sample Test 2 confirmed that the purified peptide derivative obtained in this Embodiment has significant apoptosis-inducement activity.

### Embodiment 3

An injectable with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the apoptosis-inducing peptide were commercially available products.

[ 0047 ]

Apoptosis-inducing peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 1

	0.5 (weight %)
Sodium chloride	0.9
Distilled water for injection	98.6

### Embodiment 4

The injectable solution with the following composition was manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the apoptosis-inducing peptide were commercially available products.

[ 0048 ] A derivative of an apoptosis-inducing peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 2

	0.5 (weight %)
Actinomycin D	0.005
Sodium chloride	0.9
Distilled water for injection	98.595

### Embodiment 5

Tablets with the following composition per tablet were manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the apoptosis-inducing peptide were commercially available products.

[ 0049 ]

Apoptosis-inducing peptide obtained using a method identical to that in Embodiment 1

1.0 (mg)

Actinomycin D	0.02
Lactose	162.98
Crystal cellulose	30.0
Polyvinyl pyrrolidone	5.0
Magnesium stearate	1.0

#### Embodiment 6

Tablets with the following composition per tablet were manufactured using an ordinary method. All of the ingredients other than the apoptosis-inducing peptide were commercially available products.

[ 0050 ]

Apoptosis-inducing peptide k derivative obtained using a method identical to that in

Embodiment 2	1.0 (mg)
Crystal cellulose	50.0
Corn starch	40.0
Magnesium stearate	1.0
Hydroxypropyl methylcellulose	15.0
Polyvinyl glycol (molecular weight 6000)	3.0
Ricinus oil	50.0
Methanol	40.0

[ 0051 ]

[ Effects of the Invention ] As described above in detail, the invention relates to a novel apoptosis-inducing peptide and an apoptosis-inducing agent, and according to the invention, the effects accomplished are as mentioned below.

- 1) The apoptosis-inducing peptide of the invention has no side effects, and it selectively exhibits apoptosis-inducing effects in small quantities for specific leukemia cells.
- 2) The apoptosis-inducing peptide of the invention can be provided inexpensively in mass quantity through chemical synthesis, it has high practicality and can be readily provided on a commercial scale.



3) The apoptosis-inducing peptide of the invention does not exhibit apoptosis-inducing effects on normal human cells.

4) The apoptosis-inducing peptide of the invention has the advantage of causing cell death through apoptosis of tumor cells without inducing inflammatory reactions in surrounding tissue that accompany conventional chemotherapy, radiation therapy and other cancer therapies.

[ 0052 ]

[ Sequence Listing ]

SEQ ID NO: 1

Length: 5

Type: Amino acid

Topology: Linear

Molecule type: Peptide

Sequence characteristic: A peptide, or a peptide containing the peptide as a fragment.

Sequence:

Ala Val Leu Pro Arg

1

5

---

Continued from the front page

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>:

C 07 K

14/47

Classification Symbols:

F I

A 61 K 37/02

AGZ

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**